

## 論文の内容の要旨

論文題目           Studies of drug-drug interactions based on transporter-mediated uptake  
                          in the liver  
                          (トランスポーターを介した取り込み過程で生じる薬物間相互作用の  
                          解析)

氏名                 設    楽    悦    久

薬物トランスポーターは、多くの薬物及び胆汁酸、ホルモン、エイコサノイドなどの内因性化合物の生体膜透過に関与する蛋白質である。これらのトランスポーターは肝や腎においては、薬物の体外への排泄に重要な役割を果たしている。肝臓で排泄される薬物の場合、最終的な排泄経路が代謝であっても、トランスポーターを介した膜透過の効率が消失速度を決定する重要な因子になる。したがって、トランスポーターを介した肝取り込みの阻害によって薬物間相互作用が起こる可能性がある。しかしながら、これまでのところ、このようなメカニズムで生じる薬物間相互作用の臨床での報告例はない。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 cerivastatin(CER)は、二つの異なる代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 2C8 および 3A4 により代謝を受けるので、一方が阻害を受けた場合であっても重大な相互作用は起こりにくいと考えられていた。しかしながら、免疫抑制薬 cyclosporin A (CsA)やフィブラート系高脂血症治療薬 gemfibrozil (GEM)を併用したときに、CER の血中濃度が 4-6 倍に上昇する相互作用が起こることが報告された。一方で、ラットにおいて CER はトランスポーターを介して取り込まれることから、これらの相互作用はトランスポーターを介した CER の取り込み過程に起因する可能性もある。そこで、トランスポーターを介した CER の肝への取り込みに対する他の薬剤の影響に着目して、これらの相互作用機序の検討を行った。また、本研究では、市販される凍結ヒト肝細胞およびトランスポーター発現系を用いて相互作用を定量的に予測する方法論を開発することを目的とした検討も行った。

### 1-1. ヒト凍結肝細胞における organic anion transporting polypeptides (OATP) ファミリートランスポーターの機能の評価

市販されている凍結ヒト肝細胞がトランスポーターの機能を評価する妥当な実験系になりうるかどうかを検討する目的で、異なるドナー由来の複数ロットのヒト肝細胞を用いて、凍結前後のトランスポーターの活性を比較した。また、凍結肝細胞における OATP ファミリートランスポーターの基質の取り込みに対する  $K_m$  値をトランスポーター発現系で得られた報告値と比較した。OATP ファミリートランスポーターの典型的な基質として、estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide (E<sub>2</sub>17 $\beta$ G)を用いた。

凍結前後における E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の取り込みを測定したところ、いずれのロットにおいても飽和性の取り込みが観察された。取り込み速度の絶対値には、ロット差がみられた。しかしながら、凍結前の細胞でもロット差がみられることから、凍結の影響ではなく、ドナーの個体差によるものと推察された。凍結前後における活性を比較したところ、比較的取り込み活性が維持されているロットがある一方で、取り込みが低下するロットもあった。一方、凍結肝細胞における取り込みの  $K_m$  値を見積もったところ、3.0-18  $\mu$ M であり、OATP2 および 8 での報告値(それぞれ 8, 5  $\mu$ M)と近い値であった。したがって、取り込みの絶対値が必ずしも凍結前後で維持されていない一方で、トランスポーターの性質(基質との親和性)は維持されていることが示唆された。このことから、阻害剤の影響を見積もる上では有用な実験系であることが示された。

### 1-2. CER と CsA の相互作用のメカニズム解析

CER のトランスポーターを介した取り込みおよび代謝に対する CsA の影響について検討した。トランスポーターを介した取り込みを評価する目的では、凍結ヒト肝細胞および OATP2 発現細胞、代謝を評価する目的ではヒト肝ミクロソーム(HLM)を用いた。CER はヒト肝細胞において、時間および濃度依存的な取り込みがみられた。取り込みに関する  $K_m$  値にはロット差があり、2.6-18  $\mu$ M と見積もられた。OATP2 発現細胞においても同様に時間および濃度依存的な取り込みが見られ、得られた  $K_m$  値は 4.3  $\mu$ M であった。肝細胞および OATP2 発現細胞で見られた CER の取り込みは、いずれも CsA によって濃度依存的な阻害を受けた。IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.28-0.69, 0.24  $\mu$ M であった。一方で、CER の代謝に対する CsA の影響をみたところ、3  $\mu$ M まででは影響がみられず、30  $\mu$ M まで加えた場合であっても部分的な阻害をするに過ぎなかった。これは、CYP3A4 の寄与が部分的であるためだと考えられる。

CsA の臨床非結合型血中濃度に比べて、今回得られた CsA の IC<sub>50</sub> 値は高い。しかしながら、経口投与した薬物は門脈中すなわち肝入り口近傍においては、循環血中より高濃度になると考えられる。臨床で用いられる CsA の肝入り口近傍における非結合型濃度の予測値(0.66  $\mu$ M)は、今回得られた IC<sub>50</sub> 値よりも高く、したがって、トランスポーターを介した CER の肝取り込みに対

する CsA の阻害が臨床での相互作用の一因になる可能性があることが示された。

### 1-3. CER と CsA の相互作用：ラットを用いた *in vivo* と *in vitro* の比較検討

ヒト肝細胞を用いた検討から、トランスポーターを介した肝細胞への取り込み阻害が臨床での CER と CsA の相互作用の一因であることが示唆された。しかしながら、CsA の臨床における循環血中非結合型濃度を用いて、トランスポーター阻害が相互作用の原因になっていることを定量的に証明することはできなかった。そこで、ラットを用いて CsA を静脈内持続静注したときの定常状態下循環血中非結合型濃度と CER のクリアランスに対する影響を比較検討した。ラットに CER および CsA を持続静注し、CER の血中濃度に対する CsA の影響をみたところ、CsA 投与速度（定常状態血中濃度に比例）に依存して上昇した。また、liver uptake index 法により、肝への取り込みが低下していることが示された。一方、ラット遊離肝細胞を用いた検討より、ヒト肝細胞と同程度の  $IC_{50}$  値 ( $0.20 \mu\text{M}$ ) で CsA は CER の取り込みを阻害することが示された。生体内条件に近いラット血漿存在下で検討したところ、 $IC_{50}$  値  $2.3 \mu\text{M}$  で阻害した。血漿存在下で見積もった  $IC_{50}$  値から全身クリアランスの低下を予測したところ、実際の全身クリアランスの低下と同程度であったことから、ラットにおいては *in vivo* でみられた CER と CsA の相互作用が肝取り込み阻害のみによって説明できることが示された。

### 1-4. CER と GEM の相互作用のメカニズム解析

臨床で重大な相互作用となった CER と GEM の組み合わせについてもメカニズムの解析を行った。GEM は血中において代謝物の血中濃度が高いことから、主代謝物 M3 およびグルクロン酸抱合体 (GEM-1-O-glu) の影響についても検討した。ここでは代謝に対する影響をみる目的で HLM に加えて CYP2C8 および 3A4 発現系を用い、トランスポーターを介した取り込みを見る目的では OATP2 発現細胞を用いた。GEM および GEM-1-O-glu は CER の OATP2 を介した取り込みをそれぞれ  $IC_{50}$  値  $72, 24 \mu\text{M}$  で阻害した。また、これらは CYP2C8 による CER の代謝をそれぞれ  $IC_{50}$  値  $28, 4 \mu\text{M}$  で阻害した。一方で CYP3A4 に対する阻害効果は非常に弱かった。M3 はどの過程に対しても有意な阻害が見られなかった。

得られた  $IC_{50}$  値は GEM および GEM-1-O-glu のヒト血清中での非結合型分率を求めた上で予測した臨床での循環血中非結合型濃度に比べて、いずれも低く、臨床での相互作用を説明することはできなかった。しかしながら、GEM-1-O-glu はラットにおいてはトランスポーターを介して肝に取り込まれ、肝臓内濃度が血中に比べて 35-44 倍程度になることが報告されている。ヒトにおいても多くのグルクロン酸抱合体が OATP ファミリートランスポーターの基質として肝に取り込まれることが知られており、同様のことがヒトにおいても起こると仮定すれば、肝内で高濃度となった GEM-1-O-glu によって生じる代謝阻害が臨床での相互作用のメカニズムとなりうると思われる。

## 2. 各種化合物のラット Oatp1 および Oatp2 に対する影響の比較検討

肝に発現しているトランスポーターに対する特異的阻害剤を探索し、これらの寄与を見積もることを目的として、ラット Oatp1 および 2 に対する各種化合物の阻害効果を比較検討した。この結果、NSAIDs と quinidine が Oatp1 を比較的強く阻害し、rifampicin と quinine が Oatp2 を強く阻害することがわかった。また、digoxin は Oatp2 の特異的阻害剤であることがわかった。これらを用いて、薬物の取り込みに対する個々のトランスポーターの寄与を見積もることができるとも知れない。

以上より、CER と CsA の相互作用はトランスポーターを介した取り込み過程の阻害、CER と GEM の相互作用は、トランスポーターを介して肝内に取り込まれた GEM の代謝物によって起こる代謝阻害に起因することが示された。両者は機序が異なるが、いずれの場合もトランスポーターが重要な役割を果たしていることが示された。